

Trabajo Fin de Grado

Modelos in vitro de túbulo renal proximal

Autora

Marta García Díez

Director

Ignacio Giménez López

Facultad de Medicina
2014/2015

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
3. Fisiología del túbulo proximal.....	4
4. Fuentes de células.....	5
4.1. Cultivos primarios a partir de riñón humano.....	5
4.2. Líneas celulares inmortalizadas de origen renal.....	7
4.2.1. Transfección vírica.....	8
4.2.2. hTERT, subunidad catalítica de la telomerasa humana.....	8
4.2.3. siRNA.....	9
4.3. Diferenciación de células progenitoras a fenotipo renal.....	9
4.3.1. Categorización por BrdU.....	10
4.3.2. Marcadores de células progenitoras.....	10
5. Dispositivos de túbulo renal bioartificial.....	12
5.1. Fuerza de rozamiento debida al flujo (FRF).....	13
5.2. Diferentes modelos.....	15
5.3. Evaluación de la función de la monocapa.....	16
6. Conclusiones.....	19
7. Bibliografía.....	21

RESUMEN

El túbulo proximal realiza una función fundamental en la nefrona como regulador de la homeostasis, ya que lleva a cabo la labor cuantitativa del riñón, mientras que el resto de la nefrona ajusta lo hecho en el túbulo proximal según las necesidades del organismo. Sin embargo, este segmento es también el más sensible al daño. Por estos motivos se pretenden conocer los mecanismos fisiopatológicos que intervienen en la destrucción y regeneración de estas células.

Para su estudio se han desarrollado diversos sistemas in vitro que puedan reproducir las condiciones del tejido in vivo y que a su vez permitan valorar y objetivar parámetros funcionales y morfológicos. Estos sistemas tienen en común que están compuestos por canales microfluídicos por donde se introduce un flujo con medio de cultivo y solutos, separados por una membrana sobre la que se siembran las células. De esta forma, la membrana hace de interfase entre dos medios, uno que sería el tubular, donde se encuentran las células epiteliales de túbulo proximal, y otro el intersticial o vascular. La introducción de un flujo ayuda a la polarización de las células y representa un papel tan importante como la línea celular utilizada o como la matriz sobre la que crece, para determinar sus características fenotípicas y funcionales.

Estos dispositivos supondrían una ventaja sobre los modelos de experimentación animal si consiguen reproducir las condiciones in vivo del riñón humano.

SUMMARY

The proximal tubule carries out a fundamental function in the nephron as a homeostasis regulator, considering that it is responsible for the quantitative work of the kidney, whereas the rest of the nephron only adjusts the resulting product from the proximal tubule according to the needs of the organism. However, this segment is also the most sensitive to damage. For these reasons it is interesting to understand the physiopathologic mechanisms that participate in the destruction and regeneration of these cells.

For their study it has been developed several in vitro systems that can arrange the in vivo conditions of the tissue, and at the same time allow to evaluate and to objectify functional and morphologic parameters. These systems have in common that they are formed by microfluidic channels where a flow with culture medium and solutes is introduced, separated by a membrane where cells are seeded. This way, the membrane behaves as an interphase

between two media, one would be the tubular one, where proximal tubule epithelial cells are located, and the other one the interstitial or vascular one. Introducing a flow helps to polarize cells and plays an important role to determine their phenotypic and functional features, as important as the one played by the cell line used and the matrix where it grows.

These devices would mean an advantage over test animals if they are able to recreate the conditions present in the in vivo human kidney.

Palabras clave

Renal epithelial cells, Renal proximal tubule, Microfluidic devices, Organotypic culture, Bioartificial Kidney.

INTRODUCCIÓN

El túbulo proximal es el segmento de la nefrona más sensible al daño, ya sea químico por tóxicos exógenos y endógenos, o isquémico en situaciones de shock o hipovascularización. Como se expondrá posteriormente, sus funciones son fundamentales para mantener la homeostasis del organismo, mientras que el resto de la nefrona cumple la función de ajustar el producto resultante según los requerimientos específicos de cada momento.

A lo largo de este trabajo se detallará la necesidad de desarrollar un modelo *in vitro* adecuado para la investigación y las posibilidades terapéuticas derivadas de la misma.

Lo fundamental es conseguir un modelo que reproduzca la fisiología *in vivo* en un modelo *in vitro*, para lo cual es necesario determinar qué células se deben utilizar y qué estímulos necesitan para organizarse y cumplir su función, además de establecer métodos para poder cuantificar estos parámetros.

Para empezar, las células utilizadas pueden proceder de cultivos primarios de corteza renal de riñón humano obtenidos a partir de nefrectomías, pero también pueden ser de líneas celulares inmortalizadas o células madre renales diferenciadas. Las ventajas de los cultivos primarios es que proceden de riñones y es de esperar que reproduzcan las condiciones del órgano *in vivo*, pero su mayor problema es la falta de disposición para obtenerlas en grandes cantidades. Las otras líneas pretenden resolver este problema, pero para eso han sido manipuladas y su comportamiento puede no ser el mismo que el de las células obtenidas de una nefrectomía.

Por otro lado, las células necesitan determinados estímulos para organizarse individualmente e intercelularmente y así conformar las estructuras del tejido. Para eso se ha estudiado qué estímulos requieren, ya sea factores de crecimiento, el medio de cultivo o la presencia de células de otras estirpes (células mesenquimales). En este trabajo se tratará la importancia de la estructura de la superficie en la que se cultiva, pero sobre todo de los dispositivos cuyas estructuras permiten crear interfaces tisulares y, por tanto, cuantificar la capacidad de reabsorción y secreción de las células cultivadas, además de la importancia de establecer una fuerza de rozamiento a través de un flujo para la formación de la estructura citoesquelética e intercelular más fisiológica.

FISIOLOGÍA DEL TÚBULO PROXIMAL

La función del riñón es la de mantener la homeostasis del medio interno. Esta función incluye eliminar productos de desecho, la reabsorción de agua, iones y moléculas más complejas, como glucosa y aminoácidos, y mantener el equilibrio ácido-base. En el glomérulo tiene lugar la ultrafiltración de la sangre que posteriormente en el resto de segmentos de la nefrona es corregida por mecanismos de secreción y reabsorción de acuerdo a los requerimientos del organismo.

El túbulo proximal se localiza en la corteza, entre el corpúsculo renal y el asa de Henle con la que se continúa en la médula renal.

Está formado por un epitelio columnar simple que se organiza intercelularmente a través de uniones estrechas, formando una estructura tubular con una luz central. En la membrana apical las células del epitelio presentan un ribete en cepillo formado por microvellosidades, lo que aumenta su superficie 20 veces, facilitando su función secretora y de reabsorción.

Su función es la de reabsorber la mayor parte de lo ultrafiltrado en el glomérulo, mientras que el resto de los segmentos tubulares de la nefrona ajustan este producto según la situación del organismo y sus necesidades. En las células del epitelio del túbulo proximal hay transportadores de glucosa, encargados de reabsorber el 100% de la glucosa ultrafiltrada, y bombas Na^+/K^+ ATPasa en la membrana basal celular y basolateral. El gradiente osmótico creado en la reabsorción de estas sustancias provoca la reabsorción del 70% del agua ultrafiltrada (1).

Además de la glucosa y electrolitos también se reabsorbe el 100% de las proteínas y aminoácidos a través de mecanismos de endocitosis mediados por receptores multiligando, como la megalina y cubilina, que se localizan en el ribete en cepillo de la membrana apical de las células epiteliales del túbulo proximal (1). Además, el túbulo proximal se encarga del equilibrio ácido-base, secretando a la luz H^+ y reabsorbiendo HCO_3^- según la actividad de la enzima intracelular anhidrasa carbónica.

FUENTES DE CÉLULAS

Las células del túbulo proximal son muy sensibles al daño isquémico o a los nefrotóxicos, a pesar de que diferentes tóxicos presentan ciertos tropismos para distintos segmentos de la nefrona (2). Ante estas situaciones las células pierden su ribete en cepillo, su polaridad y sufren apoptosis. La resolución de esta situación depende de células capaces de rediferenciarse y reconstruir el epitelio dañado.

Con la finalidad de fabricar estructuras de túbulo proximal es necesario reproducir las características de estas células y su organización de la forma más similar posible al órgano *in vivo*. Para esto se han utilizado diferentes líneas celulares:

- Cultivos primarios a partir de riñón humano.
- Líneas celulares inmortalizadas de origen renal.
- Diferenciación de células progenitoras a fenotipo renal.

En todos ellos es necesario poder identificar las células a través de marcadores específicos que nos dan información tanto de su estructura como de su función, y que en el caso de los cultivos primarios también servirán para poder aislarlas y diferenciarlas del resto de las células, dada la heterogeneidad celular de la nefrona.

Cultivos primarios a partir de riñón humano

Para obtener células de túbulo proximal (PTC) se toma una muestra de riñón humano o una pieza de nefrectomía, se decapsula y se separa la corteza de la médula. Posteriormente se trocea el tejido de la corteza, donde se encuentra el túbulo proximal, en fragmentos de 1 mm³ y se digiere de forma consecutiva utilizando un medio que contiene colagenasa (2, 3). Finalmente el producto se filtra a través de poros de 70 µm tras cada digestión para obtener las células de túbulo proximal (2). Sin embargo en la corteza hay más células epiteliales tubulares, como las procedentes de túbulo distal, y alguna puede escapar al filtrado.

Tras este paso hay distintas formas de purificar el producto obtenido, ya sea a través de un gradiente de densidad Percoll® (3, 4), método que consiste en mezclar la solución obtenida con un material de determinada densidad para que, tras centrifugarlo, las células se dispongan en una banda y así poder aislarlas del resto del material, o a través de técnicas inmunológicas que las diferencien fenotípicamente según las proteínas y antígenos que expresen (2, 4).

También se han conseguido aislar a partir de la orina con las PTC procedentes de la exfoliación. (5)

Los métodos que sirven para determinar las características fenotípicas de las células son:

- Inmunofluorescencia (2): uso de anticuerpos con marcadores fluorescentes para antígenos de las PTC.
- Citometría de flujo a través de FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) (2): tras el marcaje inmunofluorescente, permite identificar y separar las células según sus características antigénicas.
- *Western blotting*: determina las proteínas contenidas en las células por lo que requiere lisarlas. Primero se realiza una electroforesis para separarlas según su peso molecular, su carga u otras características, y posteriormente incubarlas con anticuerpos específicos contra las proteínas buscadas. Las bandas de los complejos formados se objetivan a través de quimioluminiscencia (2), o fluorescencia.

Otro método utilizado para separar las células es la separación inmunomagnética con micropartículas MACS (*Magnetic-Activated Cell Sorting*) utilizando anticuerpos monoclonales contra antígenos específicos de cada segmento (4).

Para diferenciar las células de túbulo proximal de las de túbulo distal, también se puede estudiar la respuesta de la muestra a ciertos estímulos hormonales, ya que los distintos segmentos responden de forma diferente y específica (4):

- PTH: aumenta marcadamente la producción de AMPc en las células de túbulo proximal.
- Calcitonina: estimula la actividad de la adenilato ciclasa en las DTC de forma dosis dependiente, mientras que en las PTC apenas se constata respuesta.
- Vasopresina: activa la producción de AMPc en las DTC siendo su actividad en el túbulo proximal insignificante.

Con respecto a los marcadores fenotípicos utilizados para distinguir y caracterizar las células de una muestra procedente de riñón a través de inmunofluorescencia, se consideran específicos del epitelio del túbulo proximal la aminopeptidasa M, acuaporina-1 y N-cadherina (Tabla 1).

Tabla 1: Marcadores fenotípicos usados para distinguir y caracterizar las células presentes en una muestra de corteza renal humana.

Específicos de células de túbulo proximal (4, 5)	<ul style="list-style-type: none"> • Aminopeptidasa M • Acuaporina-1 • N-cadherina
Marcadores epiteliales, presentes en segmentos tubulares (2, 4)	<ul style="list-style-type: none"> • Pan-citoqueratina • β-catenina • Vimentina • Zona ocludens 1
Marcadores que se encuentran en el túbulo proximal, pero no en el distal (6)	<ul style="list-style-type: none"> • Fosfatasa alcalina • γ-glutamyltranspeptidasa • Fosfatasa ácida • α-3-β-1-integrina
Específicos de otros segmentos: segmento ascendente del asa de Henle y porción proximal del túbulo contorneado distal (4)	<ul style="list-style-type: none"> • Glicoproteína de Tamm-Horsfall

En la muestra a estudio procedente de la corteza renal se pueden encontrar otros marcadores, además de los propios de epitelio renal tubular, como CD10 y CD13. Estos marcadores son específicos de células madre, como CD 24, CD 133, CD 44, Oct-4 o vimentina (7, 88). La presencia de células con estos marcadores puede hacernos pensar que hay células madre en la corteza y en el propio segmento proximal, y que por lo tanto puede haber una fuente de células madre para poder estudiar (9). Sin embargo, otra explicación es que ante el daño que sufre el riñón, las células se desdiferencian y proliferan para posteriormente tener la capacidad de regenerar el tejido rediferenciándose, es decir que no se deba a la presencia de células madre, sino a la inducción de desdiferenciación celular tras un daño (7).

Líneas celulares inmortalizadas de origen renal

Frente a los cultivos primarios, cuya ventaja es la similitud fisiológica al tejido *in vivo*, existen otras fuentes celulares cuya principal utilidad y finalidad es obtener una gran cantidad de células sin depender de muestras procedentes de humano y con una vida mayor, ya que tras

un número de pases los cultivos primarios también acaban perdiendo las características intrínsecas del tejido.

Las células que se immortalizan proceden del epitelio del túbulo proximal, en la corteza renal, a partir de un cultivo primario.

Transfección vírica

Sobre células renales cuyo origen es el túbulo proximal, de acuerdo a su aspecto morfológico, su inmunoquímica y su funcionalidad, se utilizan vectores víricos y su material genético para ser immortalizadas. En la mayoría de los casos el gen immortalizador usado en la transfección es el gen SV40T (*Simian virus 40 large antigen*). (5)

También se pueden utilizar otros oncogenes víricos, como el E6/E7 del virus del papiloma humano, utilizado en la transfección la línea celular HK-2 (10). Estas células han sido ampliamente utilizadas y estudiadas, y se ha visto su utilidad para sustituir células de cultivos primarios porque fenotípicamente presentan las características propias del epitelio del túbulo proximal bien diferenciado y reproduce experimentalmente resultados obtenidos en cultivos primarios (6). Sin embargo, en los cultivos tradicionales pueden presentar un valor limitado para conocer el metabolismo y comportamiento de moléculas extrañas o nefrotóxicas debido a que algunos transportadores, como la familia de transportadores SLC22, no son expresados por la célula (11).

Para resolver este problema se ha demostrado el papel fundamental que tienen las matrices sobre las que son cultivadas, creando microambientes similares a los del órgano *in vivo* a través de KMS (*kidney derived micro-scaffolds*) que permiten recuperar las características fisiológicas de las células. (12)

hTERT, subunidad catalítica de la telomerasa humana

En las células normales la senescencia replicativa dependiente de telomerasa tiene la función de limitar las duplicaciones de una población celular. Sobreexpresando la telomerasa las células se vuelven inmortales sin cambiar sus características fenotípicas. (10)

En el caso del túbulo proximal es suficiente con sobreexpresar de forma ectópica sólo una porción de ella, la subunidad catalítica esencial de la telomerasa humana o hTERT, sin necesidad de utilizar el material genético de vectores víricos. Las células obtenidas se

comportan estructural, morfológica y funcionalmente como las células de túbulo proximal, y mantienen este fenotipo estable hasta las 90 duplicaciones de población, por lo que son una fuente abundante de células útiles. (10)

siRNA

Este método no requiere de oncogenes, vectores ni clonación para ser inmortalizadas, permitiendo que al ser más fisiológicas, no solo tengan aplicaciones en la investigación, sino que también las puedan tener en terapias celulares en humanos. (13)

Para llevar a cabo este método, se obtuvieron células de túbulo proximal procedentes de riñones nefrectomizados aisladas a través de un método inmunomagnético. A estas células se les suprimió el mRNA de genes relacionados con el ciclo celular, como el supresor tumoral p53 o un inhibidor kinasa dependiente de ciclina, p16, aumentando el número de duplicaciones de la población de 12 a 33 y 63 respectivamente en tres meses de cultivo. Esta supresión se llevó a cabo usando un oligonucleótido antisentido (ASOs) y RNA de silenciamiento (siRNA). Tras dos semanas de discontinuar las transfecciones de siRNA las divisiones celulares cesan y vuelven a la normalidad (13).

Estas células recuperan características específicas de las células *in vivo* al ser cultivadas sobre membranas porosas, y cultivadas en dispositivos de túbulos renales bioartificiales, en la superficie interna de fibras huecas, mostraron mayor actividad y capacidad para la reabsorción de agua, sodio y glucosa. (13)

Diferenciación de células progenitoras a fenotipo renal

Se pueden obtener células madre a partir de células bien diferenciadas procedentes de diferentes tejidos, siendo necesario únicamente introducir a través de algún vector los factores de transcripción OCT4 y SOX2 para desdiferenciar células bien diferenciadas de túbulo proximal. Las células de otros orígenes pueden presentar mayor disponibilidad, pero su proceso de desdiferenciación es más complejo, ya que es necesario añadir dos factores de transcripción más, KLF4 y C-MYC. La utilidad de poder convertir las células maduras en células pluripotenciales es que se podría evitar el uso de células embrionarias y los problemas éticos vinculados, permitiría el estudio e investigación de la rediferenciación celular, y podrían ser utilizadas en medicina regenerativa (14).

Al igual que la producción de células pluripotenciales, la obtención de células progenitoras de origen renal permitirían el estudio de la rediferenciación y ser utilizadas en medicina regenerativa, y aunque no parecen una opción mejor para obtener grandes cantidades de células que las líneas inmortalizadas de células maduras, las células progenitoras renales obtenidas de un riñón adulto no presentan tantas diferencias fenotípicas con respecto a las células *in vivo* como las células inmortalizadas (8). Sin embargo, el problema fundamental de utilizar células renales progenitoras de origen renal es su disponibilidad, ya que se obtienen a partir de nefrectomías.

Se han encontrado células con capacidad regenerativa en diferentes segmentos del riñón y de la nefrona, incluyendo el epitelio tubular (7, 15), el intersticio del túbulo proximal (9), la cápsula de Bowman (16), la papila renal (17) y la unión corticomedular (18).

Categorización por BrdU

La administración de BrdU (bromodeoxiuridina) en ratas vivas permite marcar las células progenitoras adultas en diferentes tejidos. Tras esta administración se realiza la nefrectomía para objetivar qué células son positivas a BrdU utilizando diferentes métodos, como la citometría FACS. (15)

Las células marcadas se denominan LTRC (*label-retaining tubular cells*) e *in vitro* han mostrado capacidad para formar estructuras tubulares al ser cultivadas en matrices de colágeno, mientras que las negativas a BrdU no. En vivo por otro lado, al ser inoculadas en un riñón metanéfrico de rata, estas células son capaces de integrarse en él presentando plasticidad fenotípica. (15).

La categorización a través de BrdU se ha hecho a partir de tejido epitelial tubular (15), a partir de la unión corticomedular (18), y a partir de células procedentes de la papila renal (17).

Marcadores de células progenitoras

Las células renales progenitoras presentan diferentes antígenos de superficie según su origen, que a su vez dan información sobre la diferenciación que llevarán a cabo.

Se pueden obtener a partir del epitelio tubular o a partir de la cápsula de Bowman y todas ellas son CD 133+ y CD 24+. Sin embargo las procedentes de los túbulos son además CD 106- y se diferencian a epitelio tubular, y las segundas son CD 106+ y se pueden diferenciar

tanto a podocito como a epitelio tubular. Esto se debe a que las células CD 133+ y CD 24+ que no presentan CD 106 tampoco reaccionan frente al anticuerpo monoclonal contra podocalixina, presente en los progenitores de podocitos (16)

Ambas poblaciones tienen mayor capacidad regenerativa que las células renales bien diferenciadas y mayor resistencia al daño. Además, a diferencia de éstas, son capaces de integrarse en el riñón, generar más células tubulares y mejorar la función renal en ratas con fracaso renal agudo. (16)

DISPOSITIVOS DE TÚBULO RENAL BIOARTIFICIAL

Tras explicar cómo obtener y clasificar las células que se utilizar en el cultivo, es necesario saber que su comportamiento no depende sólo de ellas, si no que juegan un papel fundamental la matriz y el medio extracelular. Y tan importante como éstos son los parámetros mecánicos, como la superficie y topografía con la que interactúan y la fuerza de rozamiento debida al flujo (FRF), que inducen la organización celular, alineación, migración, diferenciación y expresión fenotípica. Combinando y controlando estos parámetros se controlaría la funcionalidad celular resultando en modelos *in vitro* de tejidos humanos más fisiológicamente representativos. (8, 21)

Los dispositivos de órganos-en-chips ofrecen un entorno más fisiológico para el cultivo de células, permitiendo que éstas se comporten de forma más similar al órgano *in vivo*, y además debido a su diseño permiten establecer interfaces que hagan las veces de interfase endotelio-epitelio renal, y por lo tanto se pueda analizar y cuantificar con precisión la función de estas células. También permite controlar los gradientes espacio temporales químicos y de oxígeno a lo largo del tiempo, y el microambiente en el que crecen las células. (19)

Los órganos-en-chips son sistemas de bioingeniería que contienen canales microfluídicos recubiertos internamente por una monocapa de células. La microfluídica es la ciencia de manipular pequeños volúmenes de líquido, entre 10^{-9} y 10^{-18} litros, a través de microcanales. Debido al pequeño tamaño de los dispositivos, el flujo introducido es fundamentalmente laminar, sin turbulencias, por lo que corrientes distintas que transcurren por el mismo microcanal apenas se mezclan. Esta propiedad permite generar grandes gradientes en un espacio muy reducido. (19)

Los primeros dispositivos estaban formados por dos microchips de silicona y acero inoxidable que posteriormente se sustituyeron por un material de goma de silicona, el poli(dimetilsiloxano) (PDMS), separados por una membrana semipermeable, generalmente de policarbonato o poliéster, simulando una interfase de tejidos. (Figura 1)

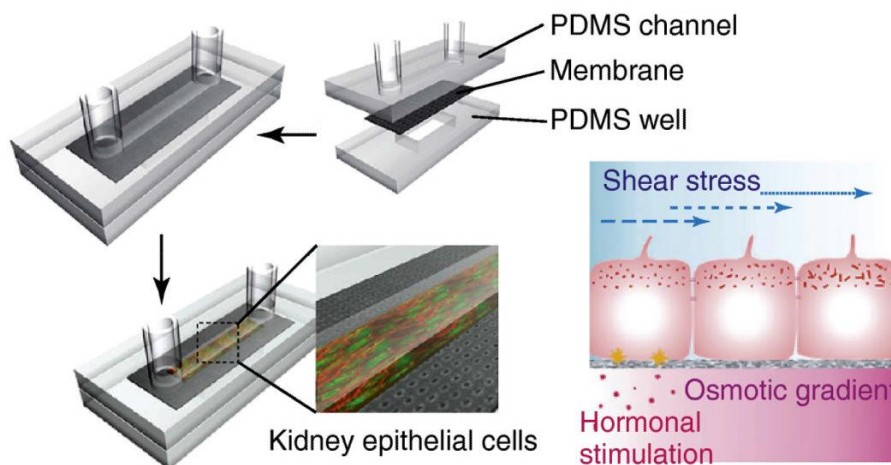


Figura 1 tomada de (19): Modelo microfluídico de epitelio renal compuesto por un dispositivo que incluye dos capas superpuestas separadas por una membrana porosa de poliéster. Se controla el flujo introducido, la exposición éste y a diferentes químicos de las membranas apical y basal, ayudando a la polarización de las células epiteliales.

El PDMS tiene una gran permeabilidad a los gases, lo que proporciona un suministro suficiente de oxígeno a las células, y además es un material transparente, lo que permite mediciones a tiempo real microfluorimétricas, y monitorizar la movilidad y morfología celular. (19)

El PDMS además tiene la propiedad de ser un material muy hidrófobo, lo que impide que el fluido introducido se filtre por los poros de los materiales, sin embargo esto también provoca que fármacos hidrófobos y sus metabolitos se adsorban al PDMS. Con la finalidad de evitar esto se puede utilizar el cristal, pero son más accesibles los materiales termoplásticos, como poli(metil metacrilato) (PMMA), poliestireno (PS), policarbonato (PC) o copolímero de olefina cíclica (COC), que son biocompatibles y presentan baja adsorción. Una forma utilizada para reducir la adsorción de estos sustratos es su oxidación con ozono o con plasma de oxígeno. (20)

Fuerza de rozamiento debida al flujo (FRF)

A través de los microcanales se introducen flujos a distintas presiones, que además e contener el medio con los nutrientes necesarios, sirven para que se establezcan una serie de fuerzas de rozamiento sobre las células. Estas fuerzas dependen tanto de la magnitud del flujo introducido como de las dimensiones del microcanal, cuya sección transversal varía de entre 100 nm y más de 100 μm , según el dispositivo. De esta forma cuanto mayor es el canal más flujo necesita para seguir ejerciendo la misma fuerza de rozamiento sobre las células.

La FRF tiene un gran efecto sobre la fisiología celular y provoca la reorganización del citoesqueleto de actina, lo que sugiere que el citoesqueleto tiene un papel importante en la mecanotransducción inducida por el flujo introducido. (Figura 2)

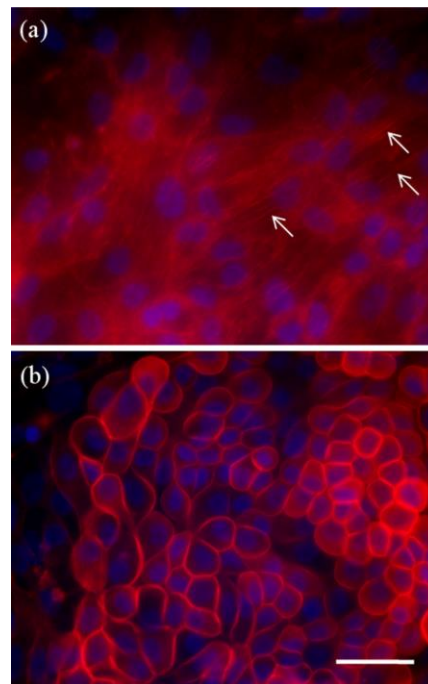


Figura 2 tomada de (22): células epiteliales renales marcadas para f-actina. (a) En condiciones estáticas. (b) Tras 6 horas de exposición a 1 dina/cm² de FRF. Tras el estímulo del flujo, el citoesqueleto de actina se reorganiza.

Ante el estímulo de la FRF las células determinan su polarización y su estructura, y los transportadores de superficie dejan de disponerse de forma arbitraria, como en el caso del transportador de acuaporina AQ2 y en la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa. Ante una FRF de entre 0,2 y 20 dinas/cm², con métodos de inmunocitoquímica se objetiva que el primero se localiza en la región apical y la segunda en la porción basolateral, en contraste con las células cultivadas de forma estática. (8) (Figura 3) (Figura 4)

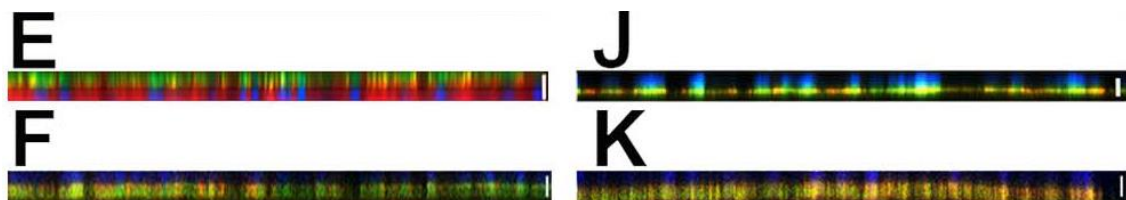


Figura 3 tomada de (8): en rojo aparecen las fibras de actina y en azul las del transportador acuaporina 2 (AQ2). Las imágenes E y J corresponden a células sometidas a una FRF de 0,2 dinas/cm² durante 6 horas, mientras que F y K están en condiciones estáticas.

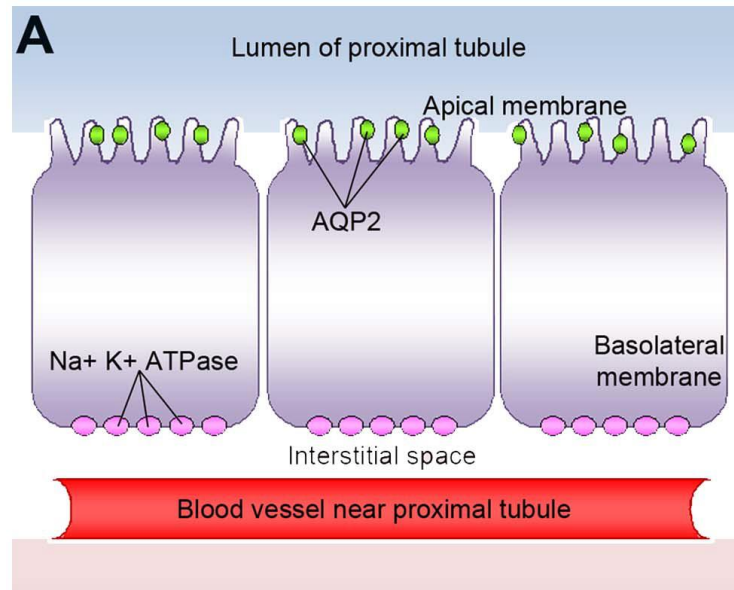


Figura 4 tomada de (8): El esquema muestra al transportador acuoporina AQ2 localizado en la membrana apical y a la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa en la membrana basolateral.

Además, la fuerza de rozamiento debida al flujo induce el doblamiento del ribete en cepillo del túbulo proximal, lo que aumenta la señal intracelular de calcio que posteriormente provoca reacciones a través de segundos mensajeros en la célula. (23)

Diferentes modelos

Como se ha explicado previamente los dispositivos están compuestos por dos microcanales que permiten el paso de un flujo microfluídicos, y separados por una membrana semipermeable. Sin embargo existen distintas modalidades y se han utilizado diferentes líneas celulares para su estudio.

Para imitar la estructura tubular los modelos se conforman por dos microcanales superpuestos. En uno de ellos se dispone una monocapa confluyente de células, la membrana es la interfase entre el túbulo y el intersticio o vaso, y el otro microcanal hace de intersticio o vaso. Estos dispositivos una vez ensamblados, presentan puertos de entrada y de salida del flujo que permiten controlar el flujo introducido y cuantificar y comparar las características de los flujos de entrada y de salida, y así cuantificar la función reabsortiva de las células tubulares y su morfología. (8)

Las líneas de células epiteliales renales utilizadas varían entre dispositivos. Se han utilizado células madre o progenitoras, seleccionadas a partir de la corteza renal humana y caracterizadas como células madre por marcadores celulares (CD133, CD24, PAX-2, CD44,

Oct-4 y BMI-1), sembradas sobre la membrana porosa hasta alcanzar la confluencia y posteriormente expuestas a un flujo laminar. (8) (Figura 5)

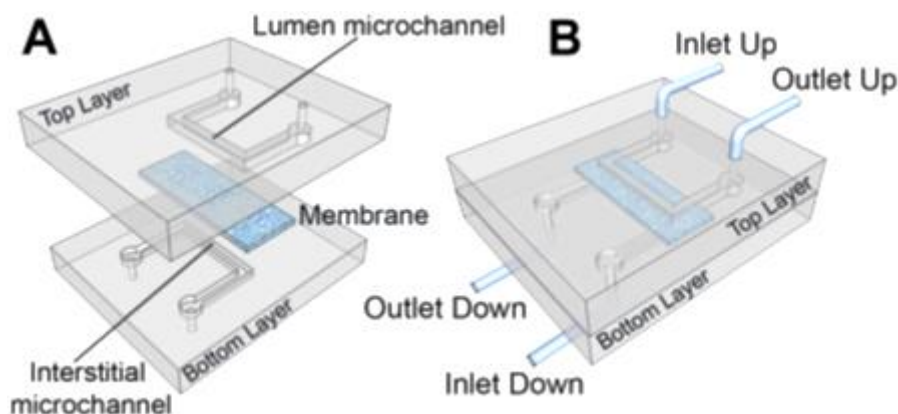


Figura 5 tomada de (8): Chip que simula la estructura *in vivo* del túbulo proximal. (A) Está compuesto por dos capas superpuestas de PDMS, que contienen microcanales separados por una membrana microporosa de policarbonato. (B) Ensamblado, el dispositivo presenta dos puertos de entrada y de salida, cada uno conectado con tubos plásticos y pulsos de inyecciones para el control de flujo.

También se han utilizado células epiteliales primarias de túbulo proximal humano, y HK-2, una línea de células inmortalizadas. Las células del cultivo primario demostraron ser más sensibles a la matriz extracelular sobre la que crecen que las líneas inmortalizadas y alcanzaron con mayor dificultad la confluencia, pero es posible formar una capa confluyente usando una matriz adecuada (1). Por otro lado las HK-2 no mostraron la misma plasticidad y morfología específica que las células progenitoras en los chips bioartificiales. (8)

Los dispositivos también pueden incluir electrodos para valorar la resistencia al paso de una corriente eléctrica a través de la interfase compuesta por la membrana microporosa, la matriz y la monocapa de células, para estudiar la integridad de ésta última.

Evaluación de la función de la monocapa

Para evaluar la capacidad de reabsorción y la integridad de la monocapa, se siembran las células en un dispositivo de los explicados hasta alcanzar la confluencia. Una vez alcanzada, se añade una perfusión que contiene una cantidad conocida de solutos, como urea, creatinina y glucosa., mientras el inferior, o intersticial, se perfunde con un flujo contracorriente libre de urea, creatinina y glucosa. Las muestras de salida de ambos flujos se recogen para estudiar el movimiento de la urea, creatinina y glucosa a través de la membrana porosa por medio de métodos colorimétricos y usando como controles negativos chips sin células. El resultado del experimento fue la recuperación de una menor cantidad de urea y creatinina en los

dispositivos donde había células que en los que no tenían, es decir, que el paso de los solutos a través de la interfase se ve afectado por la presencia de una monocapa de células confluentes. (8)

La confluencia de la monocapa y su integridad pueden demostrarse de diversas maneras, como puede ser la inmunofluorescencia con DAPI, que tiñe los núcleos de las células (1), o a través de la medición de las resistencias al paso de una corriente eléctrica de un lado a otro de la membrana donde se encuentran las células o TEER.

La TEER es la resistencia eléctrica transepitelial, y se mide incluyendo los electrodos Ag/AgCl en el dispositivo PDMS, uno a cada lado de la membrana (Figura 6). Da información a tiempo real sobre la formación de la monocapa de células y su polarización, además de sobre la permeabilidad de la misma y su integridad. (22)

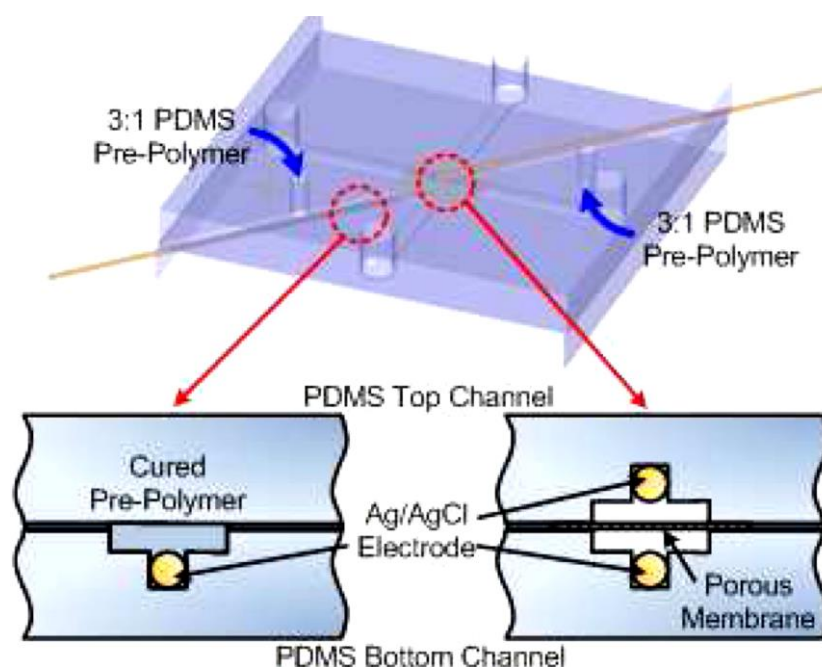


Figura 6 tomada de (24): Dispositivo formado por dos microchips de PDMS. Está diseñado para que los microcanales superior e inferior se entrecrucen y colocar en otro microcanal dispuesto a 45° del principal los electrodos Ag/AgCl para medir la resistencia al paso de una corriente eléctrica.

Para saber si la TEER es un método adecuado para medir la integridad de la monocapa, se añadió un medio con baja concentración de Ca^{2+} , que es fundamental para que se establezcan las uniones estrechas intercelulares. El resultado fue que tras la introducción de este medio, la TEER disminuye, es decir, la resistencia para el paso de la corriente eléctrica disminuye a través de la monocapa celular al impedir la formación y mantenimiento de las uniones estrechas. Tras la introducción de medio con concentraciones normales de Ca^{2+} , la TEER aumenta poco a poco porque las uniones estrechas se pueden volver a formar, demostrando

que cambios en la permeabilidad o integridad de la monocapa resulta en cambios sobre la TEER. (22, 24)

Además de la evaluación de la TEER para conocer la funcionalidad de la monocapa y su integridad, monitorizar el consumo de oxígeno es fundamental para saber si el metabolismo celular es correcto. La presencia y concentración de oxígeno en los sistemas biológicos tienen una gran importancia en el comportamiento, diferenciación y viabilidad de muchas células. Para poder medirlo se utiliza la intensidad de la fluorescencia y la vida de un marcador sensible a oxígeno, el RTDP (*ruthenium tris(2,2'-dipyridyl) dichloride hexahydrate*). Estos sistemas son muy sensibles y no consumen oxígeno ni generan productos tóxicos. (25)

CONCLUSIONES

A pesar de las capacidades que parecen demostrar estos dispositivos, aun presentan ciertas limitaciones para imitar la situación de las células y los tejidos *in vivo*, y permitir que se desarrollen de la manera más fisiológica posible.

Una limitación importante está relacionada con el hecho de que en la nefrona hay dos medios diferentes, el epitelial o tubular y el intersticial y vascular, ambos con diferentes flujos en el órgano *in vivo*. Para imitar este hecho en los dispositivos de “órganos-en-chip”, sería necesaria una perfusión constante e independiente para dos soluciones a diferentes velocidades, e incubadoras que permitan esta perfusión a largo plazo y la puedan integrar en su diseño.

Otras limitaciones que ya se han mencionado a lo largo del trabajo, son elegir la línea celular más apta y más fenotípicamente similar, las características de la matriz donde son cultivadas, el diseño de los dispositivos microfluídicos, e incluso los materiales de los mismos para que sean lo más biocompatibles posibles.

En cuanto a su uso en investigación, estos dispositivos proporcionan un método adecuado para el estudio del comportamiento celular y de los tejidos, y pueden servir como alternativa al uso de animales de experimentación en el estudio de la farmacodinamia y farmacocinética. Los modelos animales no siempre reproducen con precisión el comportamiento de los fármacos en el ser humano, y muchas de las sustancias en desarrollo con potencial terapéutico deben ser retiradas de los ensayos debido a toxicidad inesperada en humanos, lo que aumenta el gasto de producción y de investigación de los fármacos.

Los diseños de cultivos en matrices 3D y los dispositivos que incluyen una interfase de tejidos pueden ser un gran paso en nuevos métodos de investigación y suponen una ventaja si son capaces de reproducir las condiciones del órgano, usando células humanas adecuadas, ya procedan de líneas inmortalizadas, de cultivos primarios o de células progenitoras renales.

Más allá de su utilidad en el campo de la investigación, los sistemas de cultivos tridimensionales permiten el desarrollo de células *in vitro* que posteriormente se podrían reimplantar e integrarse en el riñón, algo que ha resultado en ratas. Por ahora para células humanas renales cultivadas en estos cultivos de matrices tridimensionales se ha visto que forman estructuras tubulares con función y polarización adecuadas *in vitro*. (26)

La ingeniería celular y la medicina regenerativa pretenden abordar las limitaciones de las terapias de sustitución renal y de los trasplantes. Las primeras resultan insuficientes para eliminar todos los productos tóxicos y no son una solución definitiva para los pacientes que

la precisan, prolongando la supervivencia reemplazando solo de forma parcial la función renal, ya que no cumplen otras funciones renales, como la reabsorción y la función endocrina. Por otro lado, los trasplantes, aunque sí son un tratamiento definitivo, requieren inmunosupresión de por vida, con la comorbilidad asociada, necesitan una cirugía que también presenta riesgos, y necesitan de donantes disponibles.

El riñón bioartificial podría convertirse en una buena alternativa para reemplazar las funciones renales frente a otras técnicas.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Gao X, Tanaka Y, Sugii Y, Mawatari K, Kitamori T. Basic structure and cell culture condition of a bioartificial renal tubule on chip towards a cell-based separation microdevice. *Anal Sci.* 2011;27(9):907-12.
- (2) Van der Hauwaert C, Savary G, Gnemmi V, Glowacki F, Pottier N, Bouillez A, et al. Isolation and characterization of a primary proximal tubular epithelial cell model from human kidney by CD10/CD13 double labeling. *PLoS One.* 2013 Jun 14;8(6):e66750.
- (3) Vesey DA, Qi W, Chen X, Pollock CA, Johnson DW. Isolation and primary culture of human proximal tubule cells. *Methods Mol Biol.* 2009;466:19-24.
- (4) Baer PC, Nockher WA, Haase W, Scherberich JE. Isolation of proximal and distal tubule cells from human kidney by immunomagnetic separation. Technical note. *Kidney Int.* 1997 Nov;52(5):1321-31.
- (5) Wilmer MJ, Saleem MA, Masereeuw R, Ni L, van der Velden TJ, Russel FG, et al. Novel conditionally immortalized human proximal tubule cell line expressing functional influx and efflux transporters. *Cell Tissue Res.* 2010 Feb;339(2):449-57.
- (6) Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int.* 1994 Jan;45(1):48-57.
- (7) Kusaba T, Lalli M, Kramann R, Kobayashi A, Humphreys BD. Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jan 28;111(4):1527-32.
- (8) Sciancalepore AG, Sallustio F, Girardo S, Gioia Passione L, Camposeo A, Mele E, et al. A bioartificial renal tubule device embedding human renal stem/progenitor cells. *PLoS One.* 2014 Jan 30;9(1):e87496.
- (9) Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D, et al. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol.* 2005 Feb;166(2):545-55.
- (10) Wieser M, Stadler G, Jennings P, Streubel B, Pfaller W, Ambros P, et al. hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Nov;295(5):F1365-75.

- (11) Jenkinson SE, Chung GW, van Loon E, Bakar NS, Dalzell AM, Brown CD. The limitations of renal epithelial cell line HK-2 as a model of drug transporter expression and function in the proximal tubule. *Pflugers Arch*. 2012 Dec;464(6):601-11.
- (12) Finesilver G, Bailly J, Kahana M, Mitrani E. Kidney derived micro-scaffolds enable HK-2 cells to develop more in-vivo like properties. *Exp Cell Res*. 2014 Mar 10;322(1):71-80.
- (13) Sanechika N, Sawada K, Usui Y, Hanai K, Kakuta T, Suzuki H, et al. Development of bioartificial renal tubule devices with lifespan-extended human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Sep;26(9):2761-9.
- (14) Montserrat N, Ramírez-Bajo MJ, Xia Y, Sancho-Martinez I, Moya-Rull D, Miquel-Serra L, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human renal proximal tubular cells with only two transcription factors, OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*. 2012 Jul 13;287(29):24131-8.
- (15) Maeshima A, Sakurai H, Nigam SK. Adult kidney tubular cell population showing phenotypic plasticity, tubulogenic capacity, and integration capability into developing kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Jan;17(1):188-98.
- (16) Angelotti ML, Ronconi E, Ballerini L, Peired A, Mazzinghi B, Sagrinati C, et al. Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury. *Stem Cells*. 2012 Aug;30(8):1714-25.
- (17) Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest*. 2004 Sep;114(6):795-804.
- (18) Kim K, Lee KM, Han DJ, Yu E, Cho YM. Adult stem cell-like tubular cells reside in the corticomedullary junction of the kidney. *Int J Clin Exp Pathol*. 2008 Jan 1;1(3):232-41.
- (19) Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol*. 2011 Dec;21(12):745-54.
- (20) van Midwoud PM, Janse A, Merema MT, Groothuis GM, Verpoorte E. Comparison of biocompatibility and adsorption properties of different plastics for advanced microfluidic cell and tissue culture models. *Anal Chem*. 2012 May 1;84(9):3938-44.
- (21) Kim MH, Sawada Y, Taya M, Kino-Oka M. Influence of surface topography on the human epithelial cell response to micropatterned substrates with convex and concave architectures. *J Biol Eng*. 2014 Jun 19;8:13.

- (22) Ferrell N, Desai RR, Fleischman AJ, Roy S, Humes HD, Fissell WH. A microfluidic bioreactor with integrated transepithelial electrical resistance (TEER) measurement electrodes for evaluation of renal epithelial cells. *Biotechnol Bioeng*. 2010 Nov 1;107(4):707-16.
- (23) Rydholm S, Frisk T, Kowalewski JM, Andersson Svahn H, Stemme G, Brismar H. Microfluidic devices for studies of primary cilium mediated cellular response to dynamic flow conditions. *Biomed Microdevices*. 2008 Aug;10(4):555-60.
- (24) Douville NJ, Tung YC, Li R, Wang JD, El-Sayed ME, Takayama S. Fabrication of two-layered channel system with embedded electrodes to measure resistance across epithelial and endothelial barriers. *Anal Chem*. 2010 Mar 15;82(6):2505-11.
- (25) Grist SM, Chrostowski L, Cheung KC. Optical oxygen sensors for applications in microfluidic cell culture. *Sensors (Basel)*. 2010;10(10):9286-316.
- (26) Guimaraes-Souza NK, Yamaleyeva LM, AbouShwareb T, Atala A, Yoo JJ. In vitro reconstitution of human kidney structures for renal cell therapy. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Aug;27(8):3082-90.

